

INHIBITOR OF ARTERIALIZATION

Publication number: JP8173176

Publication date: 1996-07-09

Inventor: WAKABAYASHI TOSHIKI; KAGEYAMA REINA;
FUNABASHI YASUHIRO; NARUSE YASUAKI;
YOKOYAMA YUMI; WATANABE YOSHIO; OKAMURA
KAZUHIKO

Applicant: MERCIAN CORP; EISAI CO LTD

Classification:

- international: C12P17/08; A61K31/365; A61P31/12; C07D313/00; C12R1/465; C12P17/02; A61K31/365; A61P31/00; C07D313/00; (IPC1-7): C12P17/08; A61K31/365; C07D313/00; C12P17/08; C12R1/465

- European:

Application number: JP19940319674 19941222

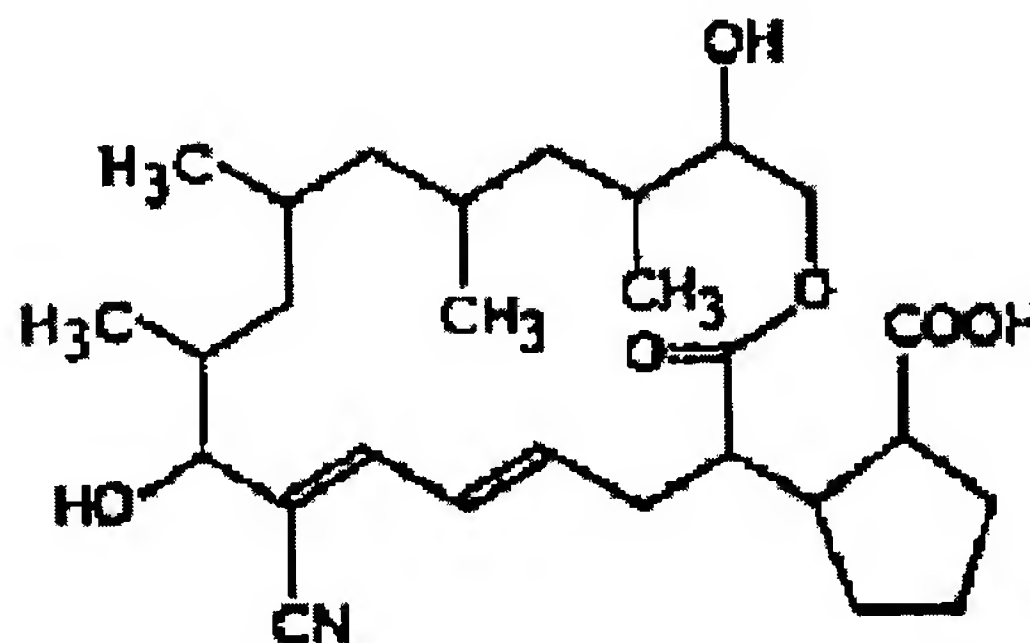
Priority number(s): JP19940319674 19941222

Report a data error here

Abstract of JP8173176

PURPOSE: To obtain an inhibitor of arterialization containing borrelidin or its salt as an active ingredient and useful for treatment, etc., of various solid cancers.

CONSTITUTION: This inhibitor of arterialization contains borrelidin, having a structural formula represented by the formula and isolated as an antibiotic substance from a culture solution of a microorganism of the genus *Streptomyces* to determine the structure thereof or its salt as an active ingredient. The borrelidin is preferably obtained by culturing *Streptomyces rochei* Mer-N 7167 (FERM P-14670) in a nutrient culture medium and collecting the borrelidin from the culture solution from the viewpoint of productivity.



(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-173176

(43) 公開日 平成8年(1996)7月9日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 17/08				
A 6 1 K 31/365	ADY			
C 0 7 D 313/00				
// (C 1 2 P 17/08				
C 1 2 R 1:465)				

審査請求 未請求 請求項の数3 O L (全 10 頁)

(21) 出願番号	特願平6-319674	(71) 出願人	000001915 メルシャン株式会社 東京都中央区京橋1丁目5番8号
(22) 出願日	平成6年(1994)12月22日	(71) 出願人	000000217 エーザイ株式会社 東京都文京区小石川4丁目6番10号
		(72) 発明者	若林 利明 茨城県つくば市下広岡668-36
		(72) 発明者	藤山 礼奈 茨城県つくば市稲荷前9-7-503
		(72) 発明者	船橋 泰博 茨城県つくば市春日3-5-1-304
		(74) 代理人	弁理士 古谷 馨 (外3名) 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血管新生阻害剤

(57) 【要約】

【目的】 新規血管新生阻害物質を提供する。

【構成】 微生物の培養液を原料として、血管新生阻害物質をスクリーニングし精製の結果、ボレリジン (Borelidin) であることを確認した。

【効果】 血管新生の異常増殖を伴う各種疾患の予防および治療剤として期待される。

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ボレリジン (Borrelidin) またはその塩を有効成分として含有してなる血管新生阻害剤。

【請求項2】 ボレリジン (Borrelidin) またはその塩を有効成分として含有してなる抗固形癌剤。

【請求項3】 ストレプトミセス・ロチェイ (*Streptomyces rochei*) Mer-N 7167 (FERM P-14670) を栄養培地中で培養し、その培養液からボレリジンを採取することを特徴とするボレリジンの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は血管新生の異常増殖を伴う各種疾患に対する予防および治療に有効な血管新生阻害剤に関する。

【0002】

【従来の技術】 血管新生は胎児期の血管樹形成や各臓器の形態的、機能的発達時に不可欠な生物学的現象であるが、成熟個体では女性性周期においてのみに生じる。しかし成熟個体において、血管新生の病的増加が様々な疾患の発症あるいは進行過程に関与していることが知られている。具体的には癌、リウマチ性関節炎、アテローム性動脈硬化症、糖尿病性網膜症、血管腫、乾せんなどが血管新生の異常を伴う疾患として挙げられる (Marsha A. et al., *Biotechnology*, 9, 630, 1991)。特に固形癌の増殖は血管新生に依存することが報告されていることから (Folkman J., *J. Natl. Cancer Inst.*, 82, 4, 1990) 血管新生阻害剤は難治性固形癌に対する新しい治療薬になると期待されている。

【0003】 これまでいくつかの血管新生阻害物質に関する報告はあるが、いまだ実用化に耐える有効な物質は見い出されていない (公開特許公報 平3-109324、公開特許公報 平3-236324、公開特許公報 平3-2184)。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 本発明は血管新生阻害活性を有する新規物質を単離し、血管新生の異常増殖を伴う各種疾患に対する予防および治療剤を提供することにある。

【0005】

【課題を解決するための手段】 上記現状に鑑み、本発明者らは微生物培養液を原料として、阻害活性がより強力で副作用の少ない新しい血管新生阻害物質の探索スクリーニングを開始した。その結果、ストレプトミセス属に属する微生物の培養液中に血管新生阻害物質が産生されることを見い出した。この活性物質を単離し、構造解析の結果、ボレリジン (Borrelidin) が血管新生阻害活性を有することを初めて見出し、本発明を完成するに至った。

【0006】 すなわち本発明は、ボレリジンまたはその塩を有効成分として含有してなる血管新生阻害剤および

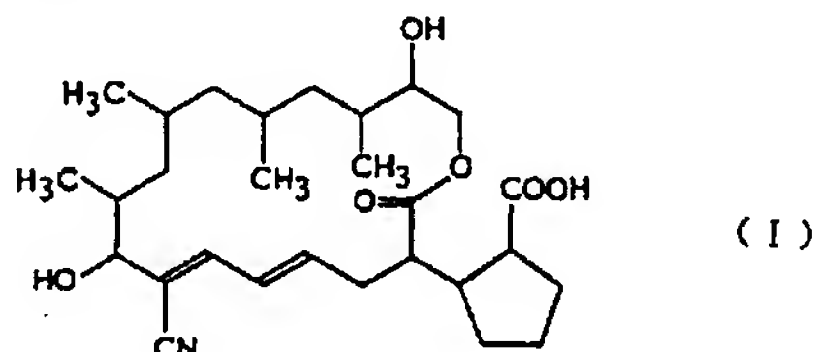
2

抗固形癌剤に関するものである。また、本発明は、ストレプトミセス・ロチェイ (*Streptomyces rochei*) Mer-N 7167 (FERM P-14670) を栄養培地中で培養し、その培養液からボレリジンを採取することを特徴とするボレリジンの製造方法に関するものである。

【0007】 ボレリジンはストレプトミセス属の微生物の培養液から抗生物質として1949年単離構造決定された化合物である (Berger J. et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, 22, 476, 1949)。化学式は2 [7-cyano-8, 16-dihydroxy-9, 11, 13, 15-tetramethyl-18-oxooxacyclooctadeca-4, 6-dien-2-yl] cyclopenta-carboxylic acid であり、構造式は下記式 (I) で表されるものである。

【0008】

【化1】



【0009】 ボレリジンは抗菌作用の他に抗ウイルス作用および抗腹水癌 (Krebs ascites tumor) 作用を有することが知られている (Dickinson L., et al., *Nature*, 206, 265, 1965)。しかし、血管新生阻害作用という全く予期されない作用を有することを本発明者らが初めて見出したものであり、ボレリジンが各種固形癌に対し予防および治療剤として期待されるものである。

【0010】 ボレリジンが腹水癌 (Krebs ascites tumor) の増殖を抑制する作用を有するとの報告はあるが、リンパ系の腹水癌と固形癌は形態的に全く異物のものである。固形癌とは例えば胃癌、肝癌、大腸癌、肺癌など異常な血管新生を伴う、固形の癌を意味し、腹水癌などリンパ系の癌は含まれない。

【0011】 以下に本発明を詳細に説明する。ボレリジンの抽出原料である微生物培養液の微生物種としては、ストレプトミセス属を選び、すでに報告されているように *Streptomyces albobovineus*, *Streptomyces rochei* および *Streptomyces* sp. C 2989 などボレリジンを産生する能力を有する微生物であればいずれも使用することができる (Singh S.K. et al., *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 27, 239, 1985; Berger J., et al., *Arch. Biochem. Biophys.*, 22, 476, 1949; Lumb M. et al., *Nature*, 206, 263, 1965)。

【0012】 その例としては、たとえばストレプトミセス・ロチェイ (*Streptomyces rochei*) ATCC10739などが挙げられるが、特にボレリジンの生産力が高く好適な菌株として、本発明者らが石垣島土壌より分離した放線菌 Mer-N 7167株が挙げられる。本菌は以下の菌学的性質を

有する。

形態；分岐し良く伸長する基生菌糸と、同じく良く伸長する気中菌糸とからなり、気中菌糸の先端は胞子化する。胞子鎖は10~50個連なり、ゆるやかなラセン状を呈するが、曲状のものも見られる。胞子の表面は平滑で大きさは直径1 μ m \times 1~2 μ m程度である。

菌体成分；ジアミノピメルン酸としては、LL-型を含み、糖はガラクトース、グルコース、マンノース、リボースを含む。

【0013】各種培地上での生育；

ISP-1 生育は中程度で、薄く白色の気中菌糸を産する。培養表面はわずかに黄色になる。

ISP-2 生育は良好で、白色の気中菌糸上に灰色ないし灰白色 (Light grayishreddish brown) の胞子を多量に産する。培養表面はわずかに黄褐色を呈する。

ISP-3 生育は良好で、胞子の色は灰紫色 (Grayish purple)、他はISP-2と同様

ISP-4 胞子の色は灰色 (Medium gray)他はISP-2と同 *

*様

ISP-5 生育は弱く、白色の気中菌糸を少し産する。

改変チロシン培地 メラニン色素は産生しない。

なお、いずれの培地でも可溶性色素はほとんど見られない。

【0014】糖資化性；

(+) グルコース、イノシトール、フラクトース、ラムノース、マンノース、アラビノース

(±) キシロース

10 (-) ラフィノース、シュクロース

(+)；良く資化する (-)；資化しない (±)；その中間

同定；本株の性状を同時に実施した *Streptomyces rochei* type strain IF0 12908の性状と比較すると、表1に示すような相違点が見られる。

【0015】

【表1】

	N 7167	IF0 12908
胞子鎖長	10~50、50以上は見られない。	10~50、50以上もまれに見られる。
コロニー色	ISP-2、3、4で灰色系色	ISP-2、4で灰色系色
可溶性色素	ほとんど見られない。	ISP-3でわずかに見られる。

【0016】このような相違はあるものの、種が異なるほどの差ではなく、ストレプトミセス・ロチエイ (*Streptomyces rochei*) の種内変動の範囲であるので、本発明者らは本菌株をストレプトミセス・ロチエイ (*Streptomyces rochei*) Mer-N 7167 と命名した。なお、本菌株は、平成6年11月28日付で工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM P-14670として寄託されている。

【0017】血管新生阻害活性のスクリーニング法として、ラット大動脈片をコラーゲンゲル内にて培養した場合に観察される管腔形成の阻害度を指標とした (Nicotia R.F., Lab. Invest., 63, 115, 1990)。また、ヒト大腸癌 WIDr 細胞株を用いてマウス皮下での血管新生阻害活性をも併せてスクリーニング法として使用した。

【0018】ストレプトミセス属の微生物を通常の適切な培養条件にて培養後、培養液を清澄濾過したのちブタノールまたはメチルイソブチルケトンなどの有機溶媒を加え抽出し、有機溶媒層を減圧下濃縮する。次いでメタノールにて抽出し、石油エーテル (light petroleum) などで処理し粗抽出物を得る。次いでシリカゲルなどを用いる吸着クロマトグラフィー、LH 20 ゲルクロマトグラフィー、分配クロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィー、

30 一、ペーパークロマトグラフィーなどを適宜利用して分離し、活性スクリーニングにより活性画分を確認する。上記手法を適宜組み合わせることにより活性物質を単離することができる。吸着クロマトグラフィーに使用する溶媒としては、クロロホルム、メタノール、アセトン、ヘキサン、トルエンなど通常使用される有機溶媒を用い、適宜濃度を選択、組み合わせ使用することができる。結晶化の溶媒としてはクロロホルムとヘキサン、またはクロロホルムと四塩化炭素などを用いることができる。一つの手法として M. Lumbらの方法がある。 (Nature, 206, 263, 1965)。単離した化合物の構造解析は、元素分析、GC-MS、NMR、融点など常法の手法によって行うことができる。

40 【0019】単離した化合物は公知物質であるボレリジンであることが判明したが、驚くべきことにボレリジンが強力な血管新生阻害活性を有することを見出した。前記の如く、各種疾患において異常な血管新生が観察されていることから、それら疾患、例えばリウマチ性関節炎、固形癌、アテローム性動脈硬化症、糖尿病性網膜症、血管腫、乾せんなどの予防剤として、また治療薬として期待されるものであり、特に抗固形癌剤として有効

である。

【0020】該化合物を各種疾患治療・予防剤として投与する場合、錠剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤、シロップ剤などとして経口的に投与してもよいし、また噴霧剤、坐剤、注射剤、外用剤、点滴剤として非経口的に投与してもよい。投与量は症状の程度、年齢、肝疾患の種類などにより著しく異なるが、通常成人1日当たり約1mg~100mgを1日1~数回にわけて投与する。

【0021】製剤化の際は通常の製剤担体を用い、常法により製造する。すなわち、経口用固形製剤を調製する場合は、主薬に賦形剤、更に必要に応じて結合剤、崩壊剤、滑沢剤、着色剤、矯味矯臭剤などを加えた後、常法により錠剤、被覆錠剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤などとする。これらの錠剤、顆粒剤には糖衣、ゼラチン衣、その他必要により適宜コーティングすることは勿論差し支えない。注射剤を調製する場合には、主薬に必要によりpH調整剤、緩衝剤、安定化剤、可溶化剤などを添加し、常法により皮下、筋肉内、静脈内用注射剤とする。

【0022】

【実施例】以下の実施例によりさらに詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。尚、例中の%は特記しない限り重量基準である。

【0023】実施例1. ポレリジンの精製と構造確認
種培地として、グリセロール 2.0%、グルコース 2.0%、大豆粉 2.0%、酵母エキス0.5%、塩化ナトリウム 0.25%、炭酸カルシウム0.32%及び微量金属溶液（硫酸銅0.25%、塩化マンガン0.25%及び硫酸亜鉛0.25%の溶液を予め調製）0.2%の組成からなる培地を用いた。生産培地としては、種培地のグリセロール 2.0%のかわりにポテト澱粉 2.0%とし、他の組成は同じものを用いた。ジャー培養に際しては、消泡剤0.05%を添加した。殺菌前pHを 7.4に調整して使用した。前記の種培地 100mlを分注した 500ml容三角フラスコを 120℃で15分間殺菌し、これにMer-N 7167株の斜面寒天培養の1白金耳を接種し、28℃で3日間振盪培養して種培養とした。生産培地15Lを、各30L容ジャー・フェルメンター2基に分注して 120℃、30分間殺菌し、種培養を各 100mlずつ接

*種し、28℃で5日間通気（0.5vvm）、攪拌（300rpm）培養した。培養終了後遠心分離して上清を集め、pH7に調整して、HP-20 カラム（3L）に吸着させ、水洗浄、20%メタノール洗浄後、80%アセトンで溶出させた。溶出液約3Lを、減圧下で濃縮してアセトンを除き、水を加えて約1Lにして、酢酸エチル1Lで2回抽出した。抽出液を減圧下で濃縮乾固し、黒褐色の油状物質を得た。この油状物質を少量のメタノールに溶解しセファデックス LH-20（400ml）の上部に載せ、メタノールで展開し、活性画分を濃縮乾固した。次に少量のクロロホルム：メタノール=50：1に溶解し、シリカゲル（Kieselgel 60）カラム（150ml）の上部に載せ、クロロホルム：メタノール=50：1、20：1及び10：1、各 500mlで溶出させた。クロロホルム：メタノール=50：1~20：1で溶出される活性画分を集め、濃縮乾固した。次に少量のアセトンに溶解し、シリカゲル（Kieselgel 60）と混ぜ、減圧下で濃縮乾固させ、シリカゲル（Kieselgel 60）カラム（150ml）の上部に載せ、ヘキサン：アセトン=3：1、2：1及び1：2、各 500mlで溶出させた。溶出しきれない画分はメタノールで押し出した。ヘキサン：アセトン=3：1~2：1で溶出される活性画分を集めた。純化されていない画分は少量のトルエン：アセトン=5：1に溶解し、シリカゲル（Kieselgel 60）カラム（50ml）の上部に載せ、トルエン：アセトン=5：1、4：1及び2：1、各 200mlで溶出させた。トルエン：アセトン=5：1で溶出される活性画分を集め、前の活性画分と併せ、611.2mgの精製物を得た。本精製物をクロロホルム約30mlに溶かして、ヘキサンで結晶化し、結晶420.0mgを得た。

【0024】このようにして精製された活性物質の物理化学的性質は次に示す通りである。

1) EI Mass スペクトル

活性物質の m/z 489 に関する高分解能 EI Massスペクトル解析の結果、 m/z 489に M^+ が観測され、分子式は $C_{28}H_{43}NO_6$ であると決定した。結果を表2に示す。

【0025】

【表2】

m/z	測定値	理論値	誤差 (mmu)	組成
489	489.3101	489.3090	+1.1	$C_{28}H_{43}NO_6$

【0026】

- 2) 紫外線吸収スペクトル：測定結果を図1に示した。
- 3) 赤外線吸収スペクトル：測定結果を図2に示した。
- 4) 1H 核磁気共鳴スペクトル：測定結果を表3に示した。

た。

【0027】

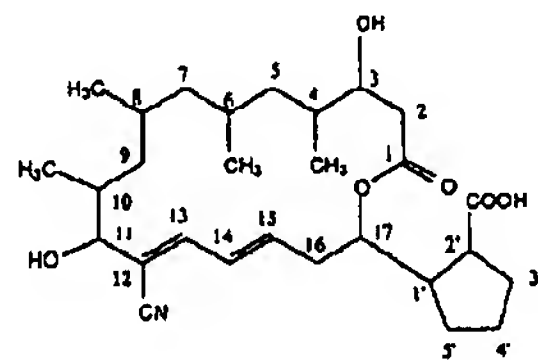
【表3】

(5)

特開平8-173176

7

8

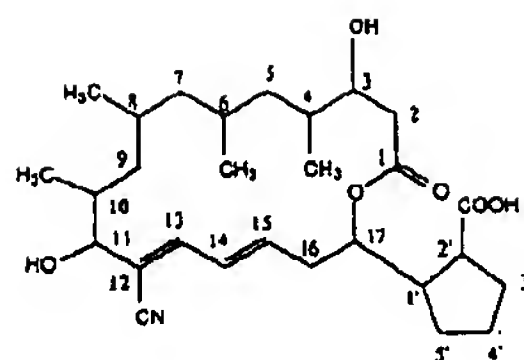
溶媒: CDCl_3 基準: CHCl_3 ; $\delta 7.26$

化学シフト(δ)	積分値	分裂様式	帰属
6.83	1	d, $J=11$	13
6.40	1	dd, $J=15, 11$	14
6.21	1	ddd, $J=15, 10, 5$	15
4.98	1	dt, $J=11, 3$	17
4.12	1	d, $J=9$	11
3.86	1	d, $J=11$	3
2.70	1	m	1'
2.59	2	m	16
2.45	1	m	2'
2.41	1	m	2(Ha)
2.33	1	dd, $J=15, 2$	2(Hb)
2.03	1	m	3'(Ha)
1.97	1	m	5'(Ha)
1.91	1	m	3'(Hb)
1.87	1	m	10
1.83	1	m	4'(Ha)
1.79	1	m	4'(Hb)
1.63	2		4, 8
1.55	1	m	6
1.37	1	m	5'(Hb)
1.25	1	m	7(Ha)
1.14	1	m	5(Ha)
1.06	3	d, $J=6$	10- CH_3
1.05	1	m	9(Ha)
0.97	1	dd, $J=13, 11$	5(Hb)
0.93	1	ddd, $J=11, 11, 3$	7(Hb)
0.86	3	d, $J=4$	8- CH_3
0.84	3	d, $J=4$	4- CH_3
0.81	3	d, $J=4$	6- CH_3
0.73	1	ddd, $J=15, 13, 3$	9(Hb)

d; doublet t; triplet m; multiplet

*Ha, Hbはジェミナル水素核で化学シフトが異なる。

【0028】5) ^{13}C 核磁気共鳴スペクトル: 測定結果
を表4に示した。【0029】
【表4】



溶媒: CDCl_3 基準: CDCl_3 ; δ 77.0

B: 化学シフト(δ) (測定値)	帰属
180.1	COOH
172.1	1
144.0	13
138.6	15
126.9	14
118.2	12
115.9	CN
76.5	17
73.1	11
69.9	3
48.7	2'
47.9	5
45.8	1'
43.1	7
39.5	2
37.5	9
36.0	16
35.7	4
35.2	10
31.2	3'
29.7	5'
27.2	6
26.3	8
25.2	4'
20.2	8- CH_3
18.3	6- CH_3
16.7	4- CH_3
14.9	10- CH_3

【0030】以上の結果から本物質はボレリジンであることが確認された。

【0031】実施例2. 血管新生阻害活性

ラット大動脈片をコラーゲンゲル内に培養し、観察される管腔形成の阻害度を血管新生阻害活性とした。すなわち、Sprague-Dawley系雌ラット(8~12週齢)より摘出した大動脈をハンクス液で洗浄しながら周辺の脂肪組織を丁寧に除去した。大動脈を切開し2mm角の切片を作成した後、24ウェルプレート内へ内皮細胞面を上にして静

置する。次に、中性化したタイプIコラーゲンゲル(Cellmatrixtype I-A: 新田ゼラチン) 500 μl を各ウェルへ注ぎクリーンベンチ内で室温下約20分間放置してゲルを固まらせた。ゲルが固まったことを確認した後500 μl の MCDB 131 (クロレラ工業社製) 培地を各ウェルに加え CO_2 インキュベーター (5% CO_2) で 37 $^\circ\text{C}$ 下培養した。翌日ボレリジンを含むMCDB 131培地と培養液を交換し、さらに培養4日目に再度ボレリジン含有のMCDB 131培地と交換して培養を続けた。そして、ボレリジン

添加後7日目の時点で、大動脈の周囲に形成された毛細血管数を顕微鏡を用いて測定した。その結果は表5に示した。表5から明らかなごとく、ボレリジンは濃度依存的に血管新生阻害作用を示し、そのIC₅₀値は約0.5 n*

*g/mlであった。尚、阻害活性はボレリジン無添加群の毛細血管数との比較で表わしてある。

【0032】

【表5】

ボレリジン濃度	検体数	阻害活性
0 ng/ml	n = 4	0 %
0.1	4	0
0.3	4	28
1	4	90
3	4	100

【0033】実施例3. in vivo 血管新生阻害活性
マウスを用いた上記作用の検討をdorsal air sac法 (Sakamoto et al., Cancer J., 1, 55-57, 1986) を一部改良した方法を用いて行った。Millipore ring (日本ミリポア社製) を0.22μm のmembrane filter (HAWP0: 日本ミリポア社製) でシールして chamber を作成する。この chamber 内へ PBS で懸濁した1×10⁷ 個のヒト大腸癌 WiDr 細胞を封入した。次に、6~8週齢のBalb/c(nu/nu) 雌マウスの背側皮下に空気の間を作製し、先の chamber を移植した。移植が完了してから6時間後にボレリジンを腹腔内へ投与し、以後1日1回3日間連続投与した。Chamber 移植4日後に⁵¹Crラベルしたマウス赤血球を尾静脈より注入し、5分後にマウスを屠殺した。次に、chamber に接した部分の皮フを切除し凍結した後に chamber に接した部分のみを正確に切り離し、γ-counter によって血液量を測定した。PBS を封入した chamber を移植した場合の血液量を前記の血液量より差し引いた値を※

※血管新生量(血液量)とした。尚、実験はコントロール (CT) は1群10匹、ボレリジン投与群は1群5匹で行った。図3に結果を示すが、1.8 および6 mg/kg 投与群で血管新生阻害作用を示した。ただし、6 mg/kg 投与群では毒性も現われ2匹のマウスが死亡した。

【0034】実施例4. ヒト大腸癌株 WiDr 細胞に対する抗腫瘍活性

3×10⁶ 個のヒト大腸癌 WiDr 細胞をBalb/c(nu/nu) マウスの皮下に移植し、翌日よりボレリジンを一日一回、週5回のスケジュールで5週間にわたり腹腔内投与した。ボレリジンは各濃度を1% NaHCO₃ 水に溶解して使用した。また経時的に腫瘍サイズを測定し、相対的腫瘍体積を算出した。その結果、表6に示されるように、ボレリジンは抗腫瘍作用を示すとともに長期連投が可能な化合物であることが判明した。

【0035】

【表6】

	腫瘍体積 (mm ³)	腫瘍体積/コントロール × 100
コントロール	736.7±284.9	100
0.18 mg/kg	620.2±291.0	84.2
0.54	550.8±105.9	74.8
1.8	522.6±336.5	70.9

【0036】実施例5. ヒト前立腺癌株PC-3細胞に対する抗腫瘍活性
3×10⁶ 個のPC-3細胞をBalb/c(nu/nu) マウス (対照群6匹、実験群6匹) の皮下に移植し、10日後よりボレリジンを1日1回腹腔内へ投与した。ボレリジンは1% NaHCO₃ 水に溶解し、1.8 mg/kg を投与した。その結果、図4に示されるように明らかな抗腫瘍作用を示した。

【0037】実施例6. 自然転移抑制作用

5×10⁵ 個のマウスB16BL6X ラノーマ細胞をマウス (対

照群10匹、実験群5匹) のfoot padへ皮下移植し、6日後よりボレリジンを1日1回10日間腹腔内へ投与した。移植後21日目に原発巣のある後肢を切断し、移植後26日目より再びボレリジンを7日間投与した。移植後33日目に肺への転移数を測定した。その結果、表7に示されるように1.8 mg/kg 投与群マウスで顕著な転移抑制効果を示した。

【0038】

【表7】

投与量 (mg/kg)		21日目の原発腫瘍のサイズ		33日目の肺転移の数	
		mm ³ ±SD ^a	T/C (%) ^b	中央値 ^c	(範囲)
コントロール		290.5±58.7	100	24	(8, 16, 17, 18, 24, 24, 29, 30, 31, 43)
ボレリジン	0.18	349.4±43.6	120	15	(8, 9, 15, 16, 61)
	0.54	364.6±133.2	126	15	(10, 15, 186)
	1.8	285.5±62.7	98.3	3 ^d	(2, 3, 3, 9, 21)

注)

a: 平均腫瘍体積±SD (21日目)

b: (薬剤投与群の腫瘍体積/コントロール群の腫瘍体積)×100 (21日目)

c: 各群の肺転移数の中央値 (33日目)

d: p<0.01 (Kruskal-wallis検定)

【図面の簡単な説明】

【図1】 実施例1で得られたボレリジンの紫外線吸収スペクトルである。

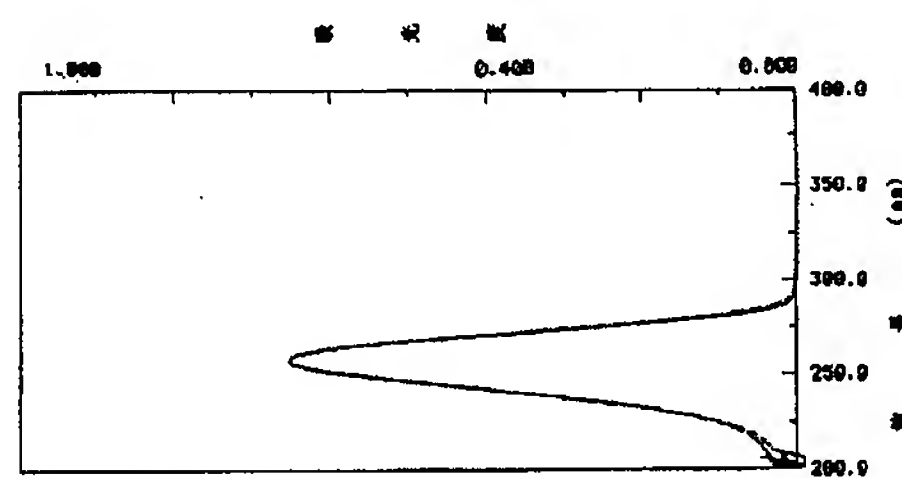
【図2】 実施例1で得られたボレリジンの赤外線吸収スペクトルである。

【図3】 実施例3で行ったマウス皮下におけるヒト大

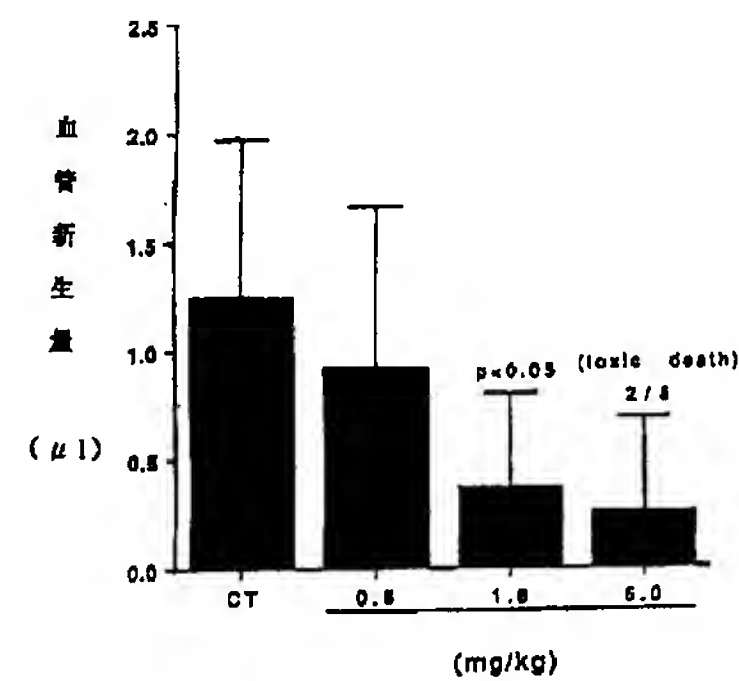
腸癌WiDr細胞株の血管新生能に対するボレリジンの効果を示す図である。

20 【図4】 実施例5で行ったマウスの皮下におけるヒト前立腺癌株PC-3細胞に対するボレリジンの抗腫瘍活性効果を示す図である。

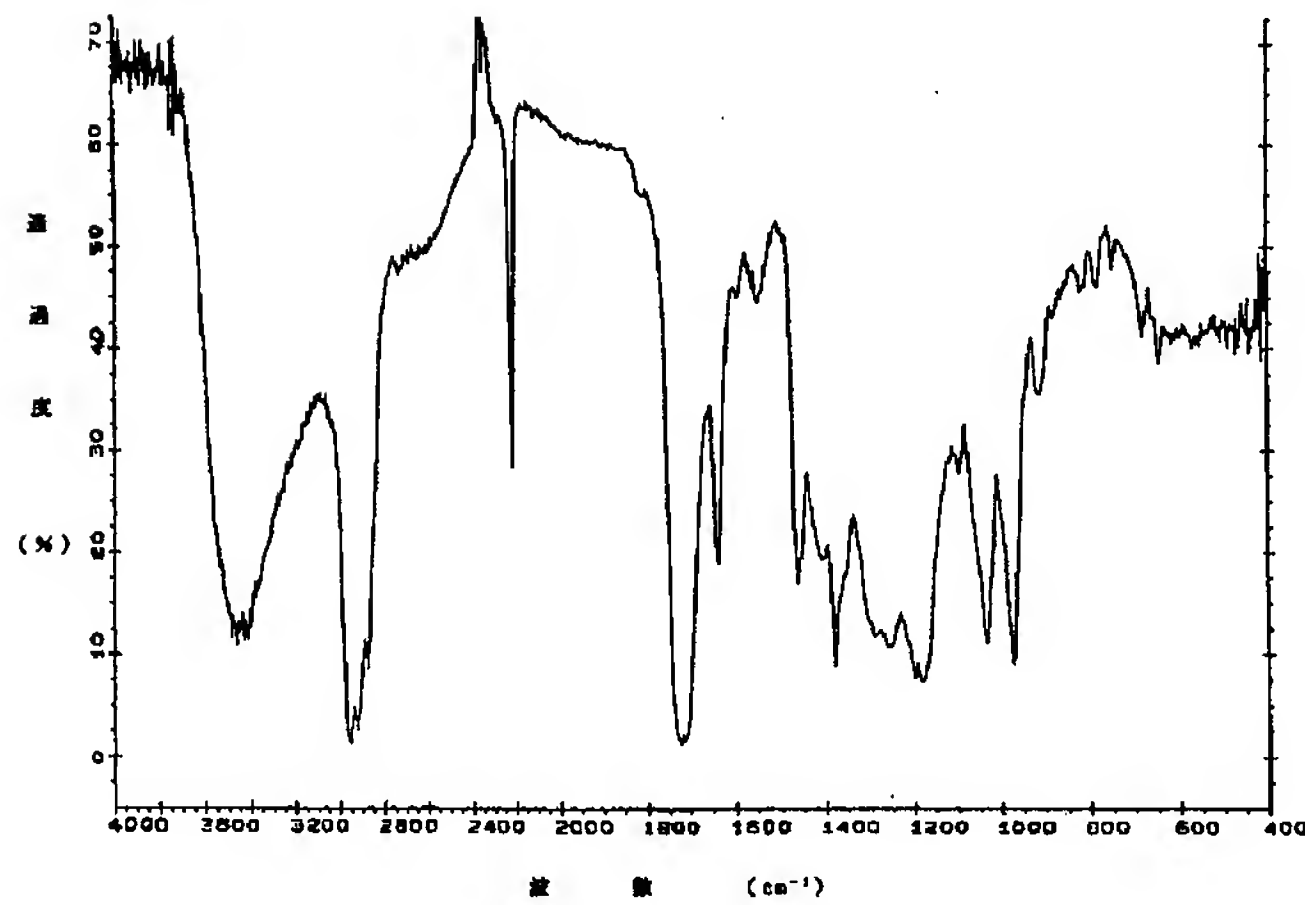
【図1】



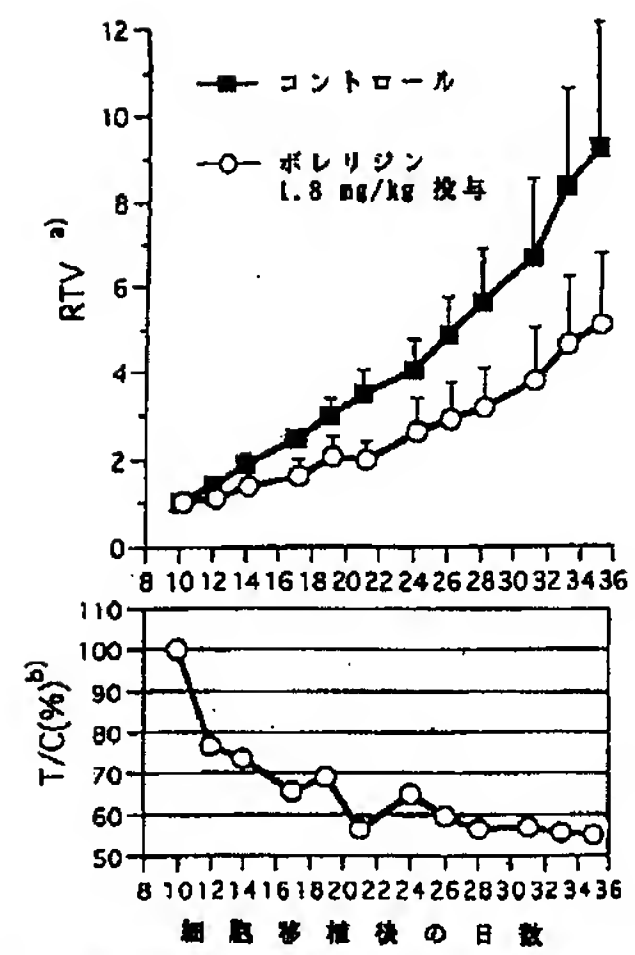
【図3】



【図2】



【図4】



a) RTV=Relative tumor volume (測定日の腫瘍体積)/(10日目の腫瘍体積)
 b) (腫瘍体積のRTV) × 100 / (コントロール群のRTV)
 $P < 0.01$: 17, 21 日
 $P < 0.05$: 12, 14, 19, 24, 26, 28, 31, 33, 35 日

【手続補正書】

【提出日】平成8年1月8日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

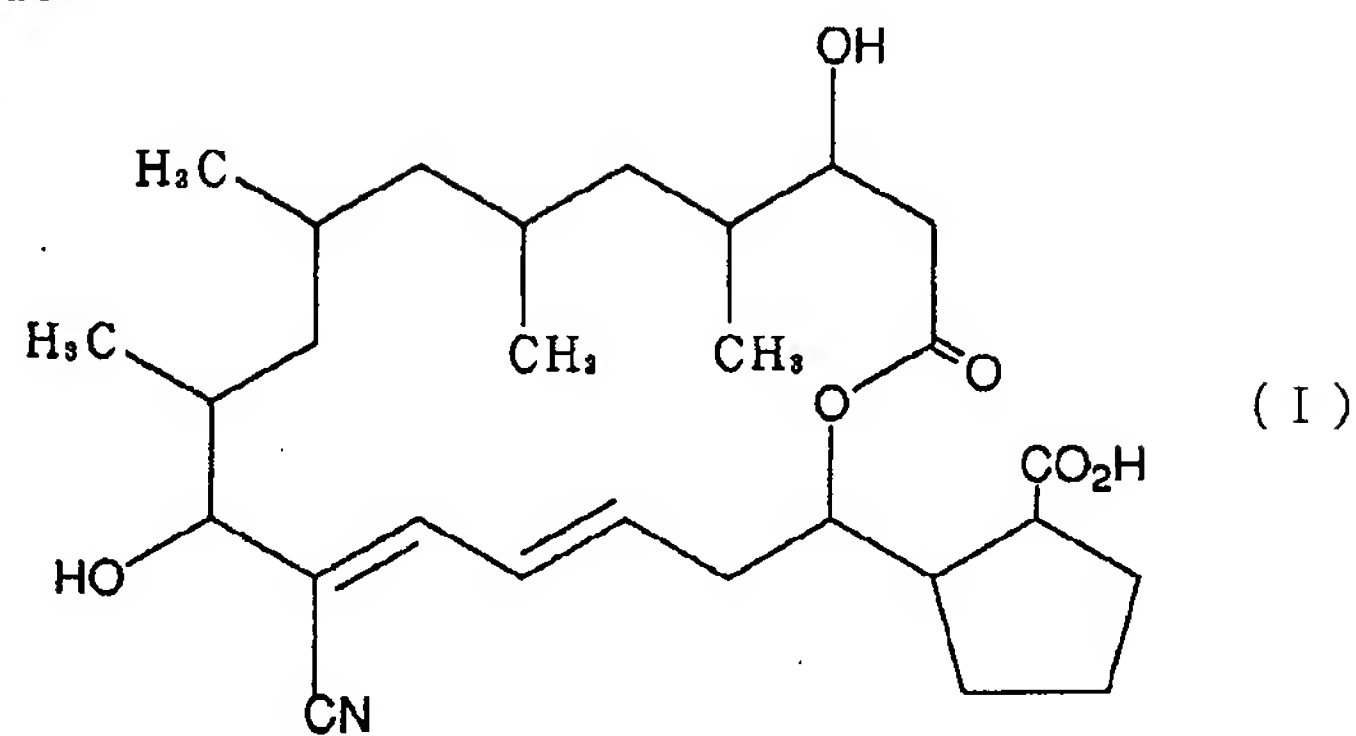
【補正対象項目名】0008

【補正方法】変更

【補正内容】

【0008】

【化1】



フロントページの続き

(72)発明者 成瀬 庸彰

茨城県牛久市南7-55-5

(72)発明者 横山 由美

茨城県新治郡新治村大畑1510-38

(72)発明者 渡辺 吉雄

神奈川県藤沢市藤が岡2-22-3

(72)発明者 岡村 和彦

神奈川県藤沢市白旗3-9-26